

УДК 617.7-001.4-002-092

Я.І. Пенішкевич

## ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ БІЛКІВ У ВОЛОЗІ ПЕРЕДНЬОЇ КАМЕРИ ОКА ПРИ ПОДВІЙНОМУ ПРОНИКНОМУ ПОРАНЕННІ СКЛЕРИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ: ВПЛИВ ЕЙКОЗАНОЇДІВ ТА БЛОКАТОРІВ ЇХ СИНТЕЗУ

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

**Резюме.** З метою вивчення впливу ейкозаноїдів, а також блокаторів їх синтезу на протеолітичну активність вологи передньої камери ока при подвійному проникному пораненні склери проведені досліді на 40 очках 40 кроликів породи Шиншила. Показано, що при подвійному проникному пораненні склери інтенсивність деградації високомолекулярних білків не змінюється, проте колагеназна активність вологи передньої камери ока зростає протягом всього періоду експерименту. Встановлено, що простагландини (PG) E<sub>1</sub> і PGF<sub>2a</sub>

зменшують ступінь деградації високомолекулярних білків, PGE<sub>2</sub> підвищує інтенсивність лізису азоказеїну за зниження інтенсивності протеолітичного розпаду колагену, а парацетамол, диклофенак і дексаметазон зменшують протеоліз високомолекулярних білків, але суттєво підвищують колагеназну активність вологи передньої камери ока у кроликів із подвійним проникним пораненням склери.

**Ключові слова:** око, склера, травма, ейкозаноїди, протеоліз.

**Вступ.** Післятравматичне запалення в оці проходить за загальними механізмами запальної реакції. У фазі альтерації пошкодження характеризується некрозом і дегенеративними змінами тканин зі звільненням медіаторів запалення, які зумовлюють у подальшому реалізацію програми фіброзних перетворень ураженої зони ока – міграцію у вогнище пошкодження сполучнотканинних елементів. Наступна фаза характеризується змінами реологічних властивостей крові, ексудацією плазми в прилеглі тканини, міграцією у вогнище ураження мезенхімальних клітин (клітини крові, фібробласти, гістіоцити та ін.), які на наступних етапах стають основними клітинними елементами, що безпосередньо беруть участь у репаративних процесах. У третій фазі відбувається проліферація гліальних і сполучнотканинних клітин, а також синтез міжклітинної речовини, який призводить до рубцювання ушкоджених тканин. Особливості перебігу кожної стадії впливають на наслідки післятравматичного запалення ока [5, 9, 8].

Отже, своєчасний лізис надмірних відкладень фібрину запобігає гіперпроліферативним змінам у травмованому оці, знижує ймовірність утворення фіброзних шварт і пов'язаних з ними ускладнень функції ока [1].

**Мета дослідження.** Вивчити вплив ейкозаноїдів, а також блокаторів їх синтезу на протеолітичний лізис високомолекулярних білків у волозі передньої камери ока при подвійному проникному пораненні склери.

**Матеріал і методи.** Робота виконана на 40 очках 40 кроликів породи Шиншила масою 2-2,5 кг (вік – 1-1,5 року). Моделювання травми ока (подвійне проникне поранення склери) проводили за асептичних умов мікрохірургічним лезом під епібульбарною анестезією 0,5 % дикаїном у поєднанні з ретробульбарною анестезією 2,0 % розчином новокаїну.

Простагландини (PG) E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> та F<sub>2a</sub> застосовували в інстиляційних дозах відповідно: 115 нг 2 рази на день, 20 мкг одноразово і 250 нг 3 рази на день протягом трьох діб (за виключенням PGF<sub>2a</sub>, який вводили протягом двох тижнів). Парацетамол вводили в дозі 0,5 мг, диклофенак і дексаметазон – 0,05 мг протягом двох тижнів (всі – шість разів на добу).

Забір вологи передньої камери (ПК) ока проводили за асептичних умов під епібульбарною анестезією 0,5 % дикаїном у динаміці 60-денного спостереження.

Визначення протеолітичної активності у волозі передньої камери ока проводилося методом лізису азосполук із використанням реактивів “Simko Ltd.” (Україна). Принцип методу полягає в тому, що при інкубації азоальбуміну, азоказеїну або азоколу в лужному середовищі за наявності інгібіторів та активаторів протеолізу, які містяться у волозі передньої камери ока, відбувається ензиматичний лізис азосполук, активність якого оцінюється за ступенем забарвлення інкубаційного розчину [2].

Статистична обробка отриманих даних проведена на РС IBM 586 за допомогою “Excel-7”.

**Результати дослідження та їх обговорення.** При подвійній проникній травмі склери лізис азоказеїну (АКЗ) зазнавав значних змін (табл. 1). Під впливом PGE<sub>1</sub> казеїнолітична активність у волозі ПК травмованого ока на 3-тю добу лікування різко знижувалася і надалі відповідала контролю. PGE<sub>2</sub> збільшував інтенсивність протеолітичної деструкції ВМБ на 3-тю, 7-му і 14-ту добу експерименту – відповідно у 2,2 раза, на 69,0 та 42,8 %, після чого лізис АКЗ від контрольних величин не відрізнявся. PGF<sub>2a</sub> впродовж 1-го тижня досліді значно зменшував (за нижні межі контролю) казеїнолітичну активність у травмованому оці, яка в наступні періоди спостереження

Таблиця 1

**Динаміка змін лізису азоказеїну (мкМ азоказеїну на 1 мл за хв) у волозі передньої камери ока під впливом екзогенних простагландинів і при блокаді синтезу ейкозаноїдів за умов подвійної проникної травми склери, ( $x \pm Sx$ )**

Серії досліджень	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	14-та доба	28-ма доба	60-та доба
Контроль, n=5	71,87 $\pm$ 4,29	63,06 $\pm$ 2,58	65,76 $\pm$ 2,88	63,29 $\pm$ 2,56	66,69 $\pm$ 3,21	68,42 $\pm$ 3,34
Травма, n=5	69,98 $\pm$ 7,03	82,96 $\pm$ 7,73	92,16 $\pm$ 7,64	99,43 $\pm$ 8,15	78,14 $\pm$ 6,68	66,00 $\pm$ 7,56
Травма + PGE <sub>1</sub> , n=5	55,54 $\pm$ 5,91	43,52 $\pm$ 5,13**	73,05 $\pm$ 6,56	66,93 $\pm$ 6,62*	60,87 $\pm$ 6,50	48,91 $\pm$ 5,30
Травма + PGE <sub>2</sub> , n=5	90,45 $\pm$ 8,33	137,23 $\pm$ 9,36**	111,11 $\pm$ 6,74	90,37 $\pm$ 9,34	81,70 $\pm$ 8,39	75,77 $\pm$ 7,08
Травма + PGF <sub>2a</sub> , n=5	37,31 $\pm$ 3,62**	43,45 $\pm$ 3,47**	51,78 $\pm$ 4,94**	81,90 $\pm$ 8,34	62,68 $\pm$ 4,95	58,73 $\pm$ 5,70
Травма + парацетамол, n=5	48,09 $\pm$ 4,51*	54,28 $\pm$ 4,74*	61,51 $\pm$ 4,70**	60,08 $\pm$ 5,14**	54,50 $\pm$ 5,12*	48,98 $\pm$ 5,20
Травма + диклофенак, n=5	45,65 $\pm$ 4,46*	48,19 $\pm$ 4,72**	54,32 $\pm$ 4,70**	66,88 $\pm$ 4,98**	62,67 $\pm$ 4,95	49,38 $\pm$ 4,75
Травма + дексаметазон, n=5	46,93 $\pm$ 4,59*	51,65 $\pm$ 4,58**	57,85 $\pm$ 4,44**	67,41 $\pm$ 4,64**	62,11 $\pm$ 5,47	49,77 $\pm$ 4,34

Примітка. – ступінь достовірності різниць показників відносно контролю: -  $p < 0,05$ ; –  $p < 0,01$ ; –  $p < 0,001$ ; \* – ступінь достовірності різниць показників відносно даних групи псевдолікованих тварин: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ; n – число спостережень

нормалізувалася. За умов дії всіх трьох інгібіторів метаболізму арахідонової кислоти лізис АКЗ був меншим за контроль на 1-шу і 60-ту доби експерименту. Парацетамол і диклофенак нормалізували лізис ВМБ із 3-ї по 28-му, а диклофенак – з 7-ї по 28-му доби спостереження.

Подвійне проникне поранення склери призводило до істотного пригнічення колагеназної активності у волозі ПК травмованого ока (табл. 2): лізис АЗК був меншим за контроль на 58,9 % – на 1-шу, на 36,9 % – на 3-тю, на 25,8 % – на 7-му, на 22,8 % – на 14-ту, на 44,8 % – на 28-му та на 61,6 % – на 60-ту добу спостереження. PGE<sub>1</sub> збільшував (табл. 2) інтенсивність колагенлізу в травмованому оці тільки в період безпосередньої дії – на 1-шу і 3-тю доби лікування (на 70,8 та 77,2 % відповідно). PGE<sub>2</sub> різко знижував колагенолітичну активність у волозі ПК пораненого ока (у 3,9 раза) на 3-тю добу, а на 7-му добу показник досягав контрольних величин. PGF<sub>2a</sub> сприяв нормалізації колагенлізу в травмованому оці на 3-тю, 7-му і 28-му доби лікування та викликав його підвищення відносно контролю на 41,4 % на 14-ту добу експерименту. При використанні парацетамолу, диклофенаку та дексаметазону інтенсив-

ність колагенлізу не відрізнялася від контрольних величин з 3-ї по 14-ту добу лікування, а після відміни інгібіторів метаболізму АК колагенолітична активність знову зменшувалася і відповідала такій у псевдолікованих тварин.

Важливий аспект проблеми репаративної регенерації – це зміни інтраокулярних гемостатичних систем. Відомо, що фібронектин є головною екстрацелюлярною матричною складовою епіретинальних мембран. У преретинальній мембрані людини виявлено білки системи регуляції агрегатного стану крові – фактор XIIIa та протеїн S, а в субретинальній рідині – плазмін [6, 4]. Прокоагулянти, плазміни та його активатори, що виробляються клітинами пігментного епітелію, безпосередньо впливають на процеси проліферації фібробластів [7].

Встановлено, що надлишковий розвиток сполучної тканини, який виникає внаслідок проникного поранення ока, призводить не тільки до порушення оптичної прозорості, але в багатьох випадках викликає тракційне відшарування внутрішніх оболонок, рубцюве зморщення і, як наслідок, атрофію очного яблука [3].

Таблиця 2

**Динаміка змін лізису азоколу (мкМ азоколу на 1 мл за хв) у волозі передньої камери ока під впливом екзогенних простагландинів і при блокаді синтезу ейкозаноїдів за умов подвійної проникної травми склери, ( $x \pm Sx$ )**

Серії досліджень	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	14-та доба	28-ма доба	60-та доба
Контроль, n=5	1,86 $\pm$ 0,08	1,88 $\pm$ 0,09	1,82 $\pm$ 0,07	1,90 $\pm$ 0,11	1,81 $\pm$ 0,06	1,87 $\pm$ 0,09
Травма, n=5	0,76 $\pm$ 0,08	1,19 $\pm$ 0,13	1,35 $\pm$ 0,13	1,47 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,08
Травма + PGE1, n=5	1,30 $\pm$ 0,13**	2,10 $\pm$ 0,21**	1,03 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,08
Травма + PGE2, n=5	0,83 $\pm$ 0,08	$\pm$ 0,21**	1,83 $\pm$ 0,13*	1,23 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,09
Травма + PGF2a, n=5	1,07 $\pm$ 0,11	1,54 $\pm$ 0,15	1,77 $\pm$ 0,19	2,69 $\pm$ 0,22**	1,56 $\pm$ 0,14*	0,93 $\pm$ 0,09
Травма + парацетамол, n=5	0,95 $\pm$ 0,11	1,52 $\pm$ 0,13	1,89 $\pm$ 0,18*	2,06 $\pm$ 0,18*	1,16 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,09
Травма + диклофенак, n=5	1,05 $\pm$ 0,11	1,77 $\pm$ 0,13**	1,99 $\pm$ 0,15*	2,13 $\pm$ 0,20*	1,30 $\pm$ 0,14	0,95 $\pm$ 0,11
Травма + дексаметазон, n=5	1,02 $\pm$ 0,11	1,66 $\pm$ 0,13*	1,94 $\pm$ 0,13*	2,04 $\pm$ 0,11*	1,25 $\pm$ 0,13	0,88 $\pm$ 0,11

Примітка. – ступінь достовірності різниць показників відносно контролю: –  $p < 0,05$ ; –  $p < 0,01$ ; –  $p < 0,001$ ; \* – ступінь достовірності різниць показників відносно даних у псевдолікованих тварин: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ; n – число спостережень

### Висновки

1. При подвійній проникній травмі склери інтенсивність деградації високомолекулярних білків зростає на третю, сьому і чотирнадцяту доби, відповідно на 31,6, 40,1 і 57,1 %, а до завершення спостереження відповідає контрольним показникам; водночас інтенсивність деградації азоколу протягом всього періоду спостереження є на 22,8-61,6 % менше за контроль.

2. Простагландин E1 знижує лізис високомолекулярних білків до контрольних величин на третю добу лікування; одночасно викликає збільшення інтенсивності колагенлізу в травмованому оці на першу і третю доби лікування (на 70,8 та 77,2 % відповідно).

3. Простагландини F2a зменшує ступінь деградації високомолекулярних білків у волозі передньої камери ока кроликів із подвійною проникною травмою склери за нижні межі контролю протягом першого тижня досліду і одночасно сприяє підвищенню лізису азоколу на 41,4 % (чотирнадцята доба).

4. Простагландин E2 підвищує інтенсивність лізису азоказеїну в 2,2 раза, на 69,0 та 42,8 % відповідно, (3-14-та доби) за умов зменшення інтенсивності протеолітичного розпаду колагену в 3,9 раза на третю добу лікування у волозі передньої камери ока кроликів із подвійною проникною травмою склери.

5. Парацетамол, диклофенак і дексаметазон зменшують інтенсивність деградації високомолекулярних білків і одночасно не викликають істотних змін інтенсивності колагенлізу, яка не відрізняється від контролю з третьої по чотирнадцяту доби лікування.

кулярних білків і одночасно не викликають істотних змін інтенсивності колагенлізу, яка не відрізняється від контролю з третьої по чотирнадцяту доби лікування.

**Перспективи подальших досліджень.** Проведені експериментальні дослідження доводять зміни протеолітичної деградації високомолекулярних білків у волозі передньої камери травмованого ока, а також необхідність її корекції сучасними медикаментозними засобами, що варто розглядати як доклінічний етап даного дослідження і потреби наступного вивчення цих процесів у клініці.

### Література

1. Пенішкевич Я.І. Інтенсивність лізису низькомолекулярних білків у волозі передньої камери ока при проникному пораненні правки і райдужки в експерименті: вплив простагландинів та інгібіторів синтезу ейкозаноїдів / Я.І. Пенішкевич // Клін. анат. та операт. хірургія. – 2014. – Т. 13, № 2 (48). – С. 85-88.
2. Кухарчук О.Л. Патогенетична роль та методи корекції інтегративних порушень гормонально-месенджерних систем регуляції гомеостазу натрію при патології нирок: автореф. дис. на здобуття наук. ст. д-ра мед. наук: 14.03.05 / Кухарчук Олександр Леонідович. – Одес. мед. ін-т. – Одеса, 1996. – 37 с.
3. Пенішкевич Я.І. Зміни інтенсивності колагенлізу у волозі передньої камери ока за проникної травми склери, обтяженої введенням ендотоксину в склоподібне тіло: вплив парацетамолу, диклофенаку, дексаметазону і простагландинів E1, E2, F2a / Я.І. Пенішкевич // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія "Медицина". – 2002. – Вип. 17. – С. 161-164.

4. Autolytic degradation of ocriplasmin: a complex mechanism unraveled by mutational analysis / B. Noppen, L. Fonteyn, F. Aerts [et al.] // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2014. – Vol. 27 (7). – P. 215-223.
5. Kessler E. Elastolytic and proteolytic enzymes / E. Kessler, M. Safrin // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1149. – P. 135-169.
6. Nishida T. Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions / T. Nishida, M. Inui, M. Nomizu // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2015. – Vol. 47. – P. 38-63.
7. Morita Y. Recovery of the Corneal Stroma Associated With Rapid Reepithelialization Induced by the Fibronectin-Derived Peptide PHSRN in 2 Cases of Corneal Perforation Due to a Persistent Epithelial Defect. / Y. Morita, N. Morishige, N. Yamada [et al.] // *Cornea.* – 2015. – Vol. 34 (11). – P. 1504-1507.
8. Saito A. Glycosaminoglycan and collagen facilitate the degradation of pigment epithelium-derived factor by chymotrypsin / A. Saito // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2013. – Vol. 77 (8). – P. 1628-1632.
9. Trypsin-mediated enzymatic degradation of type II collagen in the human vitreous / M. van Deemter, R. Kuijter, H. Harm Pas [et al.] // *Mol. Vis.* – 2013. – Vol. 20 (19). – P. 1591-1599.

## ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ ВО ВЛАГЕ ПЕРЕДНЕЙ КАМЕРЫ ГЛАЗА ПРИ ДВОЙНОМ ПРОНИКАЮЩЕМ РАНЕНИИ СКЛЕРЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ: ВЛИЯНИЕ ЭЙКОЗАНОИДОВ И БЛОКАТОРОВ ИХ СИНТЕЗА

*Я.И. Пенішкевич*

**Резюме.** С целью изучения влияния эйкозаноидов, а также блокаторов их синтеза на протеолитическую активность влаги передней камеры глаза при двойном проникающем ранении склеры проведено исследование 40 глаз 40 кроликов породы Шиншилла. Показано, что при двойном проникающем ранении склеры интенсивность деградации высокомолекулярных белков не изменяется, однако коллагеназная активность влаги передней камеры глаза увеличивается на протяжении всего периода эксперимента. Установлено, что простагландины (PG) E1 и PGF2a снижают степень деградации высокомолекулярных белков, PGE2 повышает интенсивность лизиса азоказеина при снижении интенсивности протеолитического распада коллагена, а парацетамол, диклофенак и дексаметазон снижают протеолиз высокомолекулярных белков, однако существенно повышают коллагеназную активность влаги передней камеры глаза у кроликов с двойным ранением склеры.

**Ключевые слова:** глаз, склера, травма, эйкозаноиды, протеолиз.

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF AQUEOUS HUMOUR HIGH -MOLECULAR PROTEINS DEGRADATION DUE TO DOUBLE PENETRATING SCLERAL INJURY: THE INFLUENCE OF EICOSANOIDS AND THEIR SYNTHESIS INHIBITORS

*Ya.I. Penishkevych*

**Abstract.** The influence of prostaglandins and their synthesis inhibitors on proteolytic degradation activity of rabbits aqueous humour due to double penetrating scleral injury was evaluated. The intensity of high-molecular proteins degradation due to double penetrating scleral injury does not change, while collagen activity of aqueous humour increases throughout all period of the experiment. Prostaglandins (PG) E1 and PGF2 $\alpha$  reduce degradation degree of high-molecular proteins, PGE2 increases the intensity of asocasein degradation, therefore decreasing intensity of proteolytic collagen cleavage. Paracetamol, diclofenac and dexamethasone decrease the proteolysis of high-molecular proteins, but essentially increase collagenolytic activity of anterior chamber aqueous humour of rabbit eyes due to double penetrating scleral injury.

**Key words:** eye, sclera, injury, prostaglandins, proteolysis.

Higher State Educational Institution of Ukraine “Bukovinian State Medical University” (Chernivtsi)

Рецензент – проф. В.М. Коновчук

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 4 (76). – P. 141-144

Надійшла до редакції 09.11.2015 року